植 物 分 类 学 报 42 (6):500–512 (2004)
Acta Phytotaxonomica Sinica

越南篦齿苏铁小孢子发生及其系统学意义

[1,2]欧阳海波 [2]李 勇 [2]张寿洲 [2]李 楠 [1]吴 鸿*
[1](华南农业大学生命科学学院 广州 510642)
[2](深圳市仙湖植物园 深圳 518004)

Microsporogenesis of *Cycas elongata* and its systematic implication

[1,2]OUYANG Hai-Bo [2]LI Yong [2]ZHANG Shou-Zhou [2]LI Nan [1]WU Hong*
[1](*College of Life Science*, *South China Agricultural University*, Guangzhou 510642, China)
[2](*Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden*, Shenzhen 518004, China)

Abstract Microsporogenesis and pollen ontogeny in *Cycas elongata* (Leandri) D. Y. Wang were studied to amass additional information on the reproductive biology of cycads and to provide some data for further studies on the factors causing the endangerment of this species. This species tends to initiate the male cones in middle or late May. The microsporophylls bear their microsporangia on the abaxial surface, and 3–5 microsporangia seem to be arranged radially into a sorus with a stalk. The microsporangium wall comprises one epidermis, four to five middle layers, and a tapetum. The tapetum may be derived from the outer layer of mature sporogenous tissue and conforms to secretory type. In the middle of June the microspore mother cells are produced and immediately enter into meiosis. The cytokinesis in the later stage of meiosis is both simultaneous and successive, a phenomenon observed even in the same microsporophyll. Following meiosis, the nuclei of microspore mother cells divide into four to form tetrahedral, isobilateral, tetragonal and occasionally linear tetrads in late June. Subsequently the microspores are released from tetrads. With the development of pollen, the microspores then undergo two asymmetric mitosis to form mature pollen consisting of three cells, i.e., a tube cell, a generative cell and a prothallial cell. Pollen further develops and is dispersed through the dehiscence of the sporangium in late July. In addition, both starch grains and callose have a regular dynamic distribution during the course of microsporogenesis and pollen ontogeny. The phenomenon that the cytokinesis at the later stage of meiosis in microsporogenesis is both simultaneous and successive has not been previously reported in any other cycads, even in other gymnosperms, and thus may have systematic significance and developmental implications.

Key words *Cycas elongata*, microsporogenesis, pollen ontogeny, callose, starch grain.

摘要 运用常规石蜡切片方法,结合显微荧光技术对越南篦齿苏铁 *Cycas elongata* 小孢子发生和花粉个体发育进行了研究。结果表明 其小孢子叶球 5 月中下旬开始萌动,小孢子囊着生在小孢子叶远轴面,且 3–5 小孢子囊以辐射状排列方式聚生成聚合囊。小孢子囊壁由 6–7 层细胞组成,包括表皮、中层及绒毡层。绒毡层来源于成熟造孢组织的外围细胞,其退化形式为分泌型。6 月中旬,小孢子母细胞进入减数分裂 I,至 6 月下旬形成四分体。母细胞减数分裂后胞质分裂的方式与其他苏铁类植物不同,具有连续型与同时型两种类型。7 月中旬,小孢子经过 2 次有丝分裂后,形成 3 细胞的成熟花粉粒。7 月下旬进入散粉状态。在花粉发育过程中,母细胞内淀粉粒的积累及其壁上胼胝质的沉积均呈现规律性变化。

2004-05-17 收稿,2004-09-13 收修改稿。
* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail:wh@scau.edu.cn)。

关键词　越南篦齿苏铁；小孢子发生；花粉个体发育；胼胝质；淀粉粒

越南篦齿苏铁 *Cycas elongata*（Leandri）D. Y. Wang 为苏铁科 Cycadaceae 苏铁属 *Cycas* L. 植物。其野生居群分布于越南中部，我国有引种栽培。该种与篦齿苏铁 *C. pectinata* Griff. 近缘，但两者形态特征存在较大差异（王定跃，1996b）。Leandri（1931）曾将其作为篦齿苏铁的一变种而命名为越南篦齿苏铁 *C. pectinata* var. *elongata* Leandri，后来王定跃（1996b）详细研究了两者的形态特征后，发现它们在形态上有较大差别，故将越南的'篦齿苏铁'提升为种的等级即 *C. elongata*（Leandri）D. Y. Wang（王定跃，1996b），并得到世界学者的广泛认同。

由于目前有关越南篦齿苏铁的野生分布范围及种群数目等资料有限，对其保护地位还很难确定，但种群数目有明显下降的趋势。Yang 和 Hill 认为，越南篦齿苏铁在某些地区，如多岩石的海边森林中分布比较普遍，其生境地毗连海滩，因此，越南篦齿苏铁的保护问题也可能与当地的陆地开发有关（转引自 Whitelock，2002）。李楠等（未发表资料）发现越南篦齿苏铁的生境条件恶劣，气候干旱，生长在由硅质花岗岩母质形成的砂壤中；更重要的是在其栖息地范围内很少有越南篦齿苏铁幼苗，整个群落的年龄结构呈倒金字塔形，即居群中以成年植株为主，而进行自然更新的植株幼苗极少；此外，其种子萌芽率较低，主要原因是种子内没有形成正常的胚。由此推测，越南篦齿苏铁在自身的繁育系统中可能出现了某些生殖问题。因此，对越南篦齿苏铁的生殖生物学进行系统研究，可为探讨其濒危原因提供生殖生物学方面的依据，同时也为研究其他苏铁类植物，尤其是与其近缘的国家三级保护植物篦齿苏铁的濒危机制提供参考。

苏铁类植物生殖发育过程中，小孢子发生时母细胞胞质分裂的类型一直是一个有争议的问题，连续型和同时型的小孢子发生方式在不同属的苏铁植物中都有报道（Singh，1978）。大泽米铁属 *Macrozamia* Miq. 的 *M. riedlei*（Gaudich.）C. A. Gardner 属于连续型（Baird，1939）；而 *Stangeria eriopus*（Kunze）Nash 和 *Ceratozamia mexicana* Brongn. 均属于同时型（Singh，1978；Audran，1981）。苏铁属内，已研究报道的种均为连续型（De Silva & Tambiah，1952；Rao，1961；吴先军等，1995），不过，De Silva 与 Tambiah（1952）对 *Cycas rumphii* Miq. 小孢子发生类型的判断是基于减数分裂 I 结束后，在赤道板区域的母细胞壁上出现厚的环状胼胝质带这一现象，从而推测两个子核间有细胞板的形成，但由于赤道板区域聚集丰富的淀粉粒而难以观察到细胞板（Biswas & Johri，1997）。然而在母细胞赤道区形成厚的胼胝质壁似乎是苏铁类植物小孢子发生时普遍具有的特征（Singh，1978），因此 De Silva 和 Tambiah（1952）的判断有待进一步研究验证。小孢子母细胞减数分裂时的胞质分裂类型由于在特定类群的植物内具有稳定性而在分类学中被作为一项重要的胚胎学证据（Davis，1966；Herr，1984；Tobe，1989；Johri et al.，1992），甚至用于探讨大的类群的系统演化及分类学问题（Pennell & Bell，1986；Juncosa & Tobe，1988；Caddick et al.，1998；Furness & Rudall，1999，2000；González et al.，2001；Furness et al.，2002）。因此，深入研究苏铁类植物小孢子母细胞减数分裂的胞质分裂类型可为苏铁类植物的系统分类提供重要证据。

1 材料和方法

越南篦齿苏铁的小孢子叶取自深圳仙湖植物园苏铁种质资源保护中心的栽培植株，凭证标本（刘芳齐012370）存放于深圳市仙湖植物园植物标本室（SZG）。2003年6月5日至7月28日，在同一雄株的小孢子叶球相近部位间隔一定时期取材。经改良配方的FAA（50%乙醇:冰醋酸:福尔马林=89:6:5）固定，常规石蜡切片，切片厚度6－8 μm。铁矾苏木精染色，番红复染，中性树胶封片。采用PAS反应显示淀粉粒变化规律（朱□，1963）。不过，在随后的观察过程中，首先将PAS反应处理的切片置于可见光下观察，然后利用荧光显微镜选择红外光激发，发现红外光激发下呈鲜红色的颗粒与在可见光下呈红色的淀粉粒在形状、大小和位置上完全保持一致，从而断定红外光激发下的鲜红色颗粒为淀粉粒，因此，为获得能更清楚显示淀粉粒变化的照片，采用红外光激发下Zeiss AxioCam数码相机拍照，Axiovision version（3.06）软件处理。DAPI（0.01 mg/L）与水溶性苯胺蓝溶液（0.005%）染色，UV激发下分别显示小孢子发生发育过程中细胞核和胼胝质的变化。Leica DMLB摄影显微镜观察并照相。

2 观察结果

2.1 小孢子叶球及小孢子叶形态

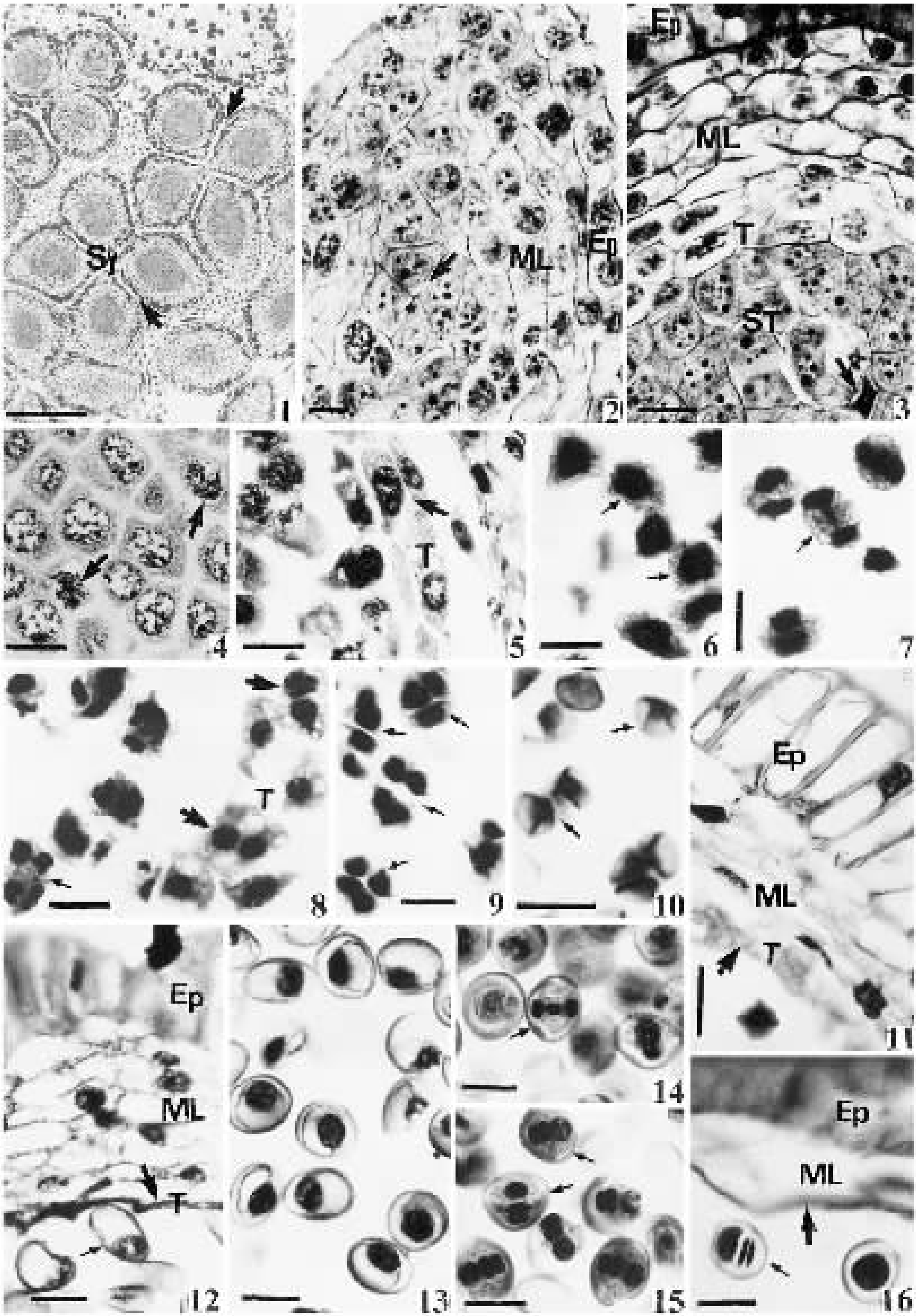
越南篦齿苏铁为雌雄异株植物，小孢子叶球着生在雄株顶端，一般每株只着生一个小孢子叶球，极少数有两个。幼嫩的小孢子叶球圆锥形，乳黄色，早期被茎顶的鳞叶紧紧包裹。6月初，小孢子叶球发育，露出鳞叶外。至7月中旬，小孢子叶球发育成熟，呈长圆锥状或圆柱形，黄褐色，长25－40 cm，直径10－15 cm，基部具短柄。

在小孢子叶球轴上，以向顶螺旋方式紧密排列大量小孢子叶。成熟小孢子叶4－5 cm长，为厚鳞片状，楔形，顶部三角状斜方形，密生黄褐色绒毛，先端具钻形长尖头。小孢子囊着生在小孢子叶的远轴面，一般3－5个以辐射方式聚生为一个小孢子囊群（图1）。

→

图1－16 光学显微镜下显示越南篦齿苏铁小孢子发生及花粉发育过程 1. 聚合囊，示4个小孢子囊排列成一个聚合囊（⬆）。2. 初生造孢细胞进一步分裂产生次生造孢细胞（⬆）。3. 小孢子囊横切，示小孢子囊壁的表皮、中层、绒毡层以及造孢组织，部分造孢细胞退化（⬆）。4. 小孢子母细胞分离，开始减数分裂（⬆）。5. 绒毡层细胞扁平形（⬆）。6. 游离的小孢子母细胞（↑）。7. 减数分裂Ⅰ末期（↑）。8. 减数分裂Ⅱ末期（↑）与双核绒毡层细胞（⬆）。9. 四面体形、左右对称形、交叉形以及直列形的四分体（↑）。10. 刚从四分体散出的小孢子（↑）。11. 四分体解体时，小孢子囊壁的结构，示解体的绒毡层（⬆）。12. 液泡化单核小孢子（↑）以及绒毡层残迹（⬆）。13. 小孢子第一次有丝分裂前呈近圆形。14. 小孢子第一次有丝分裂（↑）。15. 三细胞花粉粒（↑）。16. 散粉时花粉粒（↑）及小孢子囊壁（⬆）的结构。
Ep，表皮；ML，中层；ST，造孢组织；Sy，聚合囊；T，绒毡层。
1，标尺＝400 μm；2－16，标尺＝20 μm。

Figs. 1－16. LM photographs of microsporogenesis and pollen ontogeny in *Cycas elongata*. **1.** The synangia, showing a synangium consisting of four microsporangia (⬆). **2.** The secondary sporogenous cells originated by division of the primary sporogenous cells (⬆). **3.** Transverse section of the microsporangium, showing epidermis, middle layers, tapetum and the sporogenous tissue and degenerated sporogenous cells (⬆). **4.** The separated microspore mother cells (MMC) in meiosis (⬆). **5.** The tapetal cells flattened (⬆). **6.** Free MMC (↑). **7.** The telophase of meiosis I (↑). **8.** The telophase of meiosis II in MMC (↑) and the tapetal cells consisting of two nuclei (⬆). **9.** Tetrahedral, isobilateral, tetragonal and linear tetrads were observed (↑). **10.** Young microspores just released from tetrads (↑). **11.** Microsporangium wall at the stage of Fig. 10, showing the disorganized tapetum (⬆). **12.** Uninucleate microspores with large vacuole (↑) and the trace of tapetum (⬆). **13.** The microspores became rounded off before the first mitosis. **14.** The first mitosis of uninucleate microspore (↑). **15.** Mature pollen consisting of three cells (↑). **16.** Structure of the pollen (↑) and the sporangium wall (⬆) before dispersal of pollen.
Ep, epidermis; ML, middle layer; ST, sporogenous tissue; Sy, synangium; T, tapetum.
Scale bar = 20 μm in Figs. 2－16 and 400 μm in Fig. 1.


St
1
ML
Ep
2
Ep
ML
T
ST
3
4
T
5
6
7
T
8
9
10
Ep
ML
T
11
Ep
ML
T
12
13
14
15
Ep
ML
16

2.2 小孢子囊壁发育

苏铁植物小孢子囊为厚囊性发育,最早起源于小孢子叶原基表皮细胞下面分化出来的孢原细胞。5 月下旬,越南篦齿苏铁小孢子叶球开始萌动,此时,小孢子叶原基已经形成。孢原细胞进行多次平周分裂和垂周分裂分化形成小孢子囊的壁层及数个造孢细胞(图 2)。6 月中旬,小孢子母细胞形成时,小孢子囊壁也已分化完成。越南篦齿苏铁的小孢子囊壁一般由 6 – 7 层细胞组成,包括表皮、4 – 5 层中层和绒毡层(图 3)。在小孢子母细胞形成过程中,表皮细胞一方面进行垂周分裂增加细胞数目以适应内部组织的迅速生长,另一方面其径向壁和内切向壁也开始次生加厚。小孢子囊顶面的表皮层细胞呈径向延长,径向壁、内切向壁均木质化加厚(图 11)。绒毡层为小孢子囊壁的最内层,包围着造孢组织。绒毡层的分化一般出现在小孢子囊壁其他部分分化完全之后,因此,其起源模式与其他苏铁类植物相同,即由成熟造孢组织的外围细胞分化而来。随着小孢子母细胞的进一步发育,绒毡层细胞的细胞质变得浓厚,细胞核较大,由于小孢子囊内部压力的增大,使得绒毡层细胞或多或少呈扁平形,细胞核也延长(图 5),至减数分裂 I 末期绒毡层细胞核进行分裂形成双核细胞(图 8)。小孢子母细胞减数分裂结束后,绒毡层细胞逐渐解体,至小孢子液泡化时,绒毡层细胞仅留残存痕迹(图 12)。在表皮与绒毡层之间为壁的中层部分,其细胞壁薄,液泡大,细胞质稀少,随着造孢细胞数目的增多和体积的增大,被挤压而变得扁平(图 3)。在以后小孢子母细胞发育的过程中,中层细胞被挤压成长条形,并由内向外逐渐被吸收和解体,至小孢子第一次有丝分裂时,被挤压成一薄层紧贴表皮内侧。小孢子进行有丝分裂形成成熟的花粉粒后,中层被挤毁仅存残迹。在小孢子囊壁发育分化过程中,淀粉粒主要分布在表皮和中层细胞,而绒毡层细胞极少积累淀粉。花粉粒成熟时,小孢子囊壁几乎只剩下高度木质化的表皮层(图 16)。

2.3 小孢子发生

6 月初,越南篦齿苏铁的孢原细胞已经分裂产生小孢子囊壁层和初生造孢细胞。小孢子囊原基形成时,初生造孢细胞进一步分裂产生次生造孢细胞,次生造孢细胞与小孢子囊壁层细胞明显不同,表现在细胞体积大,壁薄,细胞核占据细胞大部分,核仁多个,细胞质丰富,液泡不明显(图 2)。次生造孢细胞经过多次垂周与平周分裂形成一团次生造孢细胞。次生造孢细胞再持续进行多次有丝分裂,至 6 月中旬,分化形成联结在一起的成熟的造孢组织,并分化出绒毡层,同时,少数造孢细胞由于被挤压或吸收,趋于退化并解体,可能为其他造孢细胞的发育提供空间或营养(图 3)。小孢子母细胞进一步发育,彼此逐渐分离,此时,游离的母细胞呈多边形,核仁多位于核一侧并紧贴核膜,部分母细胞内染色质丝明显可见,表明小孢子母细胞已进入减数分裂前期 I(图 4)。减数分裂前,母细胞开始积累淀粉粒(图 17)。

小孢子母细胞减数分裂 I 前期的早期,细胞体积有所增大,细胞质浓厚,细胞核占据细胞体积大部分(图 6),并移向细胞的一端,而另一端则集聚一团淀粉粒(图 18)。随着减数分裂的进行,母细胞形状逐渐变成圆形或椭圆形,淀粉粒逐渐均匀分布于核周围(图 19)。母细胞的核相变化表现正常(图 7,8)。在同一小孢子囊中,减数分裂的进行并不完全同步。二分体时,淀粉粒集中分布在赤道板区域(图 20)。小孢子母细胞在二分体形成后随即进行减数分裂 II。母细胞减数分裂时的胞质分裂方式存在两种类型,即连续型

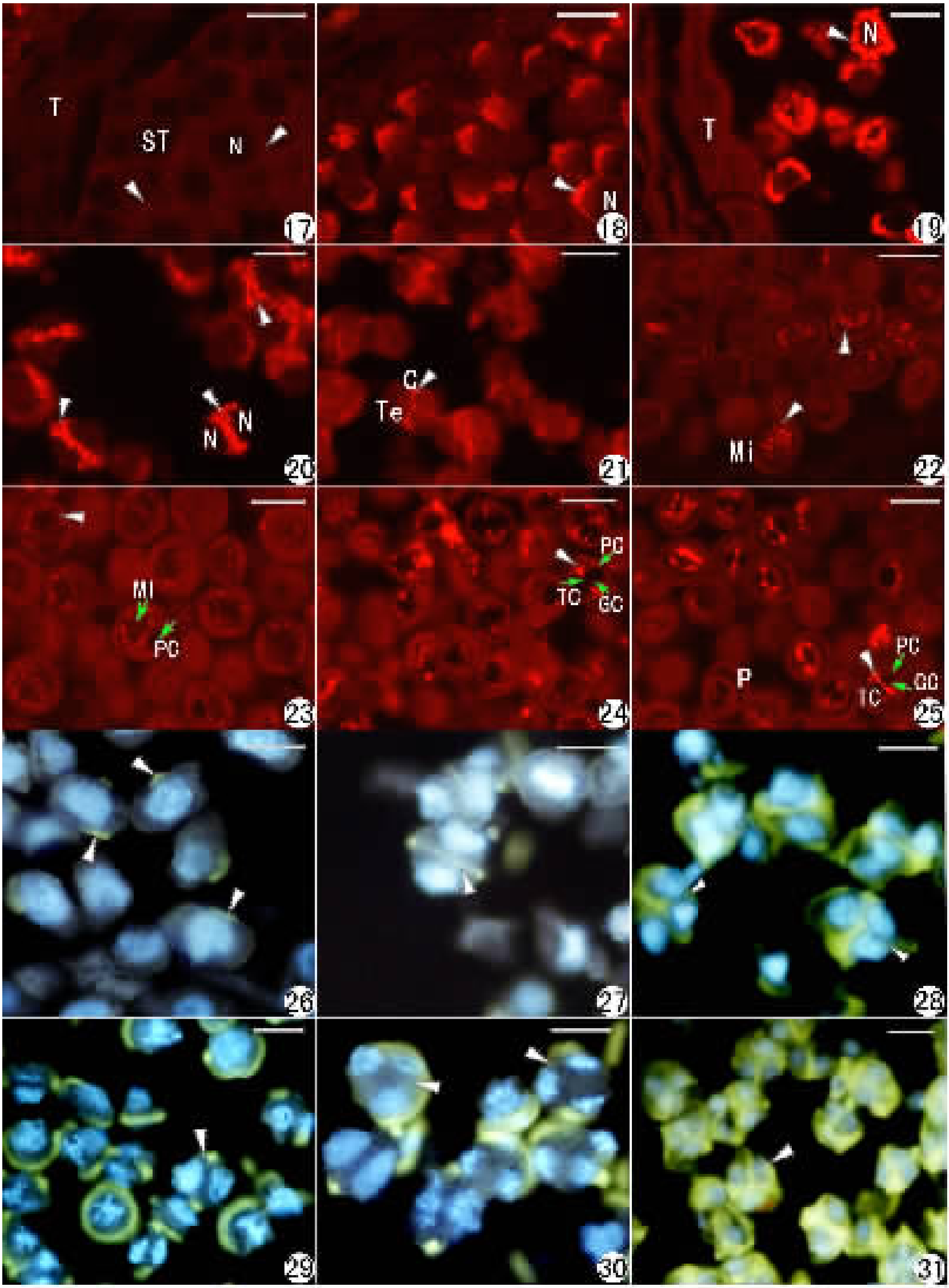
(60%)与同时型(40%)，但在同一个小孢子囊内只有一种类型。连续型小孢子母细胞在减数分裂Ⅰ末期，两个子核间形成分隔壁，同时向心式沉积胼胝质，将两个子核完全分开(图 27)；而同时型小孢子母细胞只在减数分裂Ⅱ末期以向心方式同时在 4 个子核之间形成胼胝质壁(图 29,30)。最后 4 个小孢子被厚厚的胼胝质壁包围(图 31)。在四分体中，4 个小孢子的排列方式以四面体形为主，此外也有左右对称形、交叉形，偶有直列式(图 9)。四分体后期，母细胞内淀粉粒消失(图 21)。

小孢子母细胞发育过程中，胼胝质在母细胞壁上的沉积表现出规律性变化。小孢子母细胞进入减数分裂后，胼胝质首先在减数分裂Ⅰ末期将要形成细胞板的位置的细胞壁上沉积，呈不连续分布(图 26)。随着减数分裂的进行，母细胞的胼胝质壁出现两种不一样的发育方式：其一，在发生连续型胞质分裂的母细胞中，至减数分裂Ⅰ末期，两子核间形成细胞板，环绕母细胞的胼胝质壁逐渐沿细胞板向母细胞中央扩展，最终在赤道板区域形成厚的胼胝质壁，同时，胼胝质壁也向母细胞两极延伸，渐渐包裹住母细胞(图 27)，至减数分裂Ⅱ结束时，母细胞中央及两极的胼胝质壁又逐渐向第二次分裂形成的两个子核间延伸，最终胼胝质壁将母细胞分隔成四分小孢子(图 28)；其二，与前者不同的是，减数分裂Ⅰ结束后，胼胝质只在赤道板区域的母细胞壁上沉积，且逐渐增厚，并不向细胞中央延伸(图 29,30)，仅往两侧扩展，直到减数分裂Ⅱ末期才在 4 个子核间以向心地形成缢缩沟的方式沉积胼胝质，最终产生四分体(图 31)。

2.4　花粉个体发育

小孢子四分体时期是短暂的，约持续 2 d。6 月底，母细胞的胼胝质壁溶解，释放出球状或半球状的小孢子。刚释放出来的小孢子含有丰富的细胞质和位于中央的细胞核，核体积较大，结构松散(图 10,11)。小孢子进一步发育，持续 3 – 4 d 后，体积迅速增大，壁增厚，细胞质发生液泡化，并逐渐形成一个大液泡，将细胞核挤向细胞一侧，细胞质也成一薄层贴着细胞壁，小孢子细胞呈不规则形状，在切面上多为长椭圆形、肾形等(图 12)。

游离出来的小孢子大约经过 10 d 的发育分化，形状逐渐变成圆形或椭圆形(图 13)，然后进行第一次有丝分裂。小孢子有丝分裂前开始积累淀粉，初期淀粉颗粒数量少(图 22)。分裂时细胞核在略贴近细胞壁的位置。第一次有丝分裂形成 1 个原叶细胞和 1 个分生组织原始细胞(Foster & Gifford，1974)，最初二者细胞核大小无明显差别，均为长圆形，随着花粉发育，分生组织原始细胞核变大，染色较淡，核呈球状，而原叶细胞暂时无明显变化(图 14)。此时，淀粉粒均匀分布于分生组织原始细胞的细胞质中(图 23)。随后，分生组织原始细胞进行有丝分裂，形成 1 个靠近原叶细胞的生殖细胞和 1 个较大的管细胞(图 15)。花粉中的淀粉粒渐渐移向管细胞靠生殖细胞一侧的位置，由于生殖核与管核紧靠在一起，淀粉粒暂时分布在生殖细胞两侧的管细胞中(图 24)，随着管核与生殖核间距的加大，淀粉粒也移向两核间的位置，呈一直线形(图 25)。同一小孢子囊中，有丝分裂的启动与结束并不完全一致。两次有丝分裂结束后，花粉进一步发育，至散粉前，原叶细胞与生殖细胞均变成线状结构(图 16)。花粉中的淀粉粒被吸收消失，但花粉内的物质被染成均匀的红色。散粉状态的花粉结构与其他苏铁类植物成熟花粉粒一样为三细胞花粉，即：1 个原叶细胞、1 个生殖细胞和 1 个管细胞。此外，我们还观察到在部分小孢子囊的中央有一小团败育的花粉粒。


T
ST
N
17
N
18
N
T
19
N
N
20
C
Te
21
Mi
22
Mi
PC
23
PC
TC
GC
24
P
PC
GC
TC
25
26
27
28
29
30
31

3 讨 论

3.1 减数分裂的胞质分裂类型及其系统学意义

在越南篦齿苏铁小孢子发生过程中，值得特别注意的特征是减数分裂后的胞质分裂存在同时型和连续型两种方式，这显然与其他苏铁类植物，甚至与同属的种类都明显不同（Baird，1939；De Silva & Tambiah，1952；Rao，1961；Singh，1978；Audran，1981；吴先军等，1995）。两种类型同时存在于同一种植物的情况在裸子植物中未见报道，被子植物中也较罕见（Johri et al.，1992）。Juncosa 和 Tobe（1988）在红树科 Rhizophoraceae 的 *Crossostylis* J. R. Forst & G. Forst、*Gynotroches* Blume、*Pellacalyx* Korth. 等几个属中发现同一种植物内，甚至同一雄蕊上同时具有两种类型的小孢子发生方式。他们推测，这类特殊的胞质分裂类型可能说明小孢子的发生方式是由绒毡层的分泌物控制的，而非单个的小孢子母细胞，这显然在遗传发育上具有很重要的意义。

小孢子发生时母细胞的胞质分裂类型一直在植物分类学上被作为一项很有价值的胚胎学证据（Davis，1966；Herr，1984；Tobe，1989；Johri et al.，1992）。在苏铁类植物中，其小孢子发生类型具有很大的变异性。大泽米铁属的 *Macrozamia riedlei* 属于连续型（Baird，1939）；而 *Stangeria eriopus* 和 *Ceratozamia mexicana* 均属于同时型（Singh，1978；Audran，1981）苏铁属内，已有研究报道的种均为连续型（De Silva & Tambiah，1952；Rao，1961；吴

←

图 17－25 红外光激发下，显示小孢子发生及花粉发育过程中淀粉粒动态性变化的荧光照片 17．母细胞联结时，淀粉粒极少（箭头）。18．淀粉粒（箭头）聚集在母细胞的一端。19．示减数分裂 I 期淀粉粒分布于细胞核周围（箭头）。20．减数分裂 I 末期，几乎所有淀粉粒聚集在母细胞赤道板区域（箭头）。21．四分体后期，淀粉粒消失，胼胝质壁形成（箭头）。22．单核小孢子第一次有丝分裂前，再次积累淀粉粒（箭头）。23．淀粉粒均匀分布在分生组织原始细胞内（箭头）。24．小孢子第二次有丝分裂后，淀粉粒集中分布在管细胞靠生殖细胞一侧的位置（箭头）。25．散粉时，仅小孢子囊中央少部分花粉含有淀粉粒（箭头）。 图 26－31 DAPI 与苯胺蓝染色小孢子母细胞的荧光照片，示胼胝质的沉积与母细胞的胞质分裂类型 26．减数分裂早期，母细胞壁开始沉积胼胝质（箭头）。27，28．示连续型胞质分裂。27．减数分裂 I 末期，两子核之间形成分隔壁（箭头）。28．减数分裂 II 末期，母细胞第二次形成细胞壁（箭头）。29，30．示同时型减数分裂。29．同时型的减数分裂 I。30．减数分裂 II 后期，4 个子核间无分隔壁的形成。31．四分体。
C，胼胝质；GC，生殖细胞；MI，分生组织原始细胞；Mi，单核小孢子；N，细胞核；P，成熟花粉粒；PC，原叶细胞；ST，造孢组织；TC，管细胞；Te，四分体。
标尺＝20 μm。

Figs. 17－25. Fluorescent images were taken with exciter infrared, showing the dynamic distribution of the starch grains during microsporogenesis and pollen development in *Cycas elongata*. **17**. Few starch grains (arrowheads) were observed in the microspore mother cells (MMC) connecting each other. **18**. Aggregations of starch grains (arrowhead) in one side of MMC. **19**. During meiosis I, starch grains (arrowhead) were more or less evenly distributed around the nucleus of MMC. **20**. At the telophase of meiosis I, almost all of the starch grains were distributed on the equatorial plate (arrowheads). **21**. No starch grains were observed in MMC at the tetrad stage and callose wall had been formed (arrowhead). **22**. Before the first mitosis, the uninucleate microspores were beginning to store up starch grains (arrowheads). **23**. After the formation of prothallial cell, more starch grains were evenly distributed in the meristematic initials (arrowhead) than those in prothallial cell. **24**. After the second mitosis, pollen accumulated starch grains in the tube cell's side adjoined to generative cell. **25**. In the course of dispersal of pollen, there was only a little pollen containing starch grains in the center of microsporangium cavity. **Figs. 26－31.** Fluorescent images of microsporocytes stained with DAPI and aniline blue, showing regular deposition of the callose and cytokinesis of MMC. **26**. The MMC at the early stage of meiosis, the callose (arrowheads) accumulated on the wall of the MMC on the equatorial plate. Figs. 27 and 28 show successive cytokinesis. **27**. First meiotic division resulted in the formation of a dyad. Note the wall between the two cells of a dyad (arrowhead). **28**. At the telophase of meiosis II, the wall (arrowhead) was formed in MMC again. Figs. 29 and 30 show simultaneous microsporogenesis. **29**. Meiosis I of the MMC with simultaneous cytokinesis. **30**. At the stage of anaphase of meiosis II, no partition was observed in MMC (arrowheads). **31**. Tetrads (arrowhead).
C, callose; GC, generative cell; MI, meristematic initial; Mi, uninucleate microspore; N, nucleus; P, mature pollen; PC, prothallial cell; ST, sporogenous tissue; TC, tube cell; Te, tetrad.
Scale bar＝20 μm.

先军等,1995)。植物小孢子发生时其母细胞的胞质分裂类型在特定的植物类群中是稳定的(胡适宜,1982),因此我们同样应该重视这一胚胎学证据在苏铁类植物中的系统学意义。目前,苏铁类植物属水平上的分类已经没有太大争议,但在属下等级的分类上仍然存在很多问题(Norstog & Nicholls, 1997),至少在苏铁属内还没有一个令人满意的分类系统。Hill(1994,1995)在前人的分类基础上提出一个新的苏铁属分类系统,即把苏铁属分为拳叶苏铁组 sect. *Cycas*、苏铁组 sect. *Asiorientales* Schuster、暹罗苏铁组 sect. *Indosinenses* Schuster 和叉叶苏铁组 sect. *Stangerioides* Smitinand 4 个组。王定跃(1996a,2000)又主要根据大孢子叶球紧密型、大孢子叶顶片边缘羽状至篦齿状分裂以及种子结构特征提出一个新的分类系统,即把苏铁属分为攀枝花苏铁亚属 subgen. *Panzhihuaenses* Wang、拳叶苏铁亚属 subgen. *Cycas*、刺叶苏铁亚属 subgen. *Truncata* de Laub. 以及奥苏铁亚属 subgen. *Media* Wang,其中攀枝花苏铁亚属下面又分为攀枝花苏铁组 sect. *Panzhihuaenses* 与暹罗苏铁组 sect. *Indosinenses* Schuster。当然,这一系统还有待以后进一步研究验证(陈家瑞,李楠,2003)。长期以来,人们把越南篦齿苏铁归为苏铁属下的暹罗苏铁组的处理基本上是一致的(王定跃,1996a),但 de Laubenfels 和 Adema(1998)也曾将越南篦齿苏铁归为超苏铁属 *Epicycas* de Laub.——根据苏铁属中树干大部分都生长在地下或具分支的地下球状茎等特征以及包括暹罗苏铁 *C. siamensis* Miq. 在内所建立的一个新属,然而这个新建立的属并未被多数人接受(Jones,2002;陈家瑞,李楠,2003)。不过,包括越南篦齿苏铁在内的这一类苏铁植物的形态特征与苏铁属的其他植物类群的差异却是显而易见的。本文研究结果表明,越南篦齿苏铁小孢子母细胞的胞质分裂同时具有两种类型,与苏铁属其他物种比较,这一特征无疑是特异性的。由此可见,该种所代表的类群可能在一定程度上是十分孤立的,或许在很早以前,苏铁属内这一类植物就已经与其他类群发生分离,各自沿着独立的演化路线进行发育。因此,结合其他形态学特征上的差异,我们认为,在王定跃(1996a,2000)的分类系统中,包括越南篦齿苏铁的暹罗苏铁组可能是一个比较独立的自然类群,在分类上可以作为一个独立的分支而与苏铁属下的其他组相区别,而王定跃(1996a,2000)将其与攀枝花苏铁组一起归为攀枝花苏铁亚属的处理是值得商榷的,还有待对小孢子母细胞胞质分裂类型在苏铁类植物中的分布有了更全面的了解后进一步验证。相反,在 Hill(1994,1995)的分类系统中,将苏铁属分为 4 个组的处理可能是更为自然的分类。

需要提及的是,从本文对越南篦齿苏铁的研究来看,今后对苏铁类植物小孢子母细胞胞质分裂类型的研究应该更慎重。鉴于某一种苏铁类植物中可能存在两种类型的小孢子发生方式,而且其减数分裂 I 末期至减数分裂结束持续的时间很短,同一小孢子叶球上不同部位的小孢子囊发育具有不同步性,因此采集实验材料时应该注意把握取材时间以及每次分别在小孢子叶球的上中下不同部位同时取材,否则对小孢子发生时母细胞胞质分裂类型的判断难免会产生偏差。

3.2 淀粉变化规律及其生物学意义

作为能量的主要来源和造壁物质,淀粉粒在越南篦齿苏铁小孢子发生和发育过程中表现出规律性分布和动态性变化。

小孢子发生时期,淀粉粒的变化规律不仅与另两种苏铁类植物基本一致(Audran,1981;吴先军等,1995),甚至同一些松杉类裸子植物也有所相似(肖德兴,陈祖铿,1990;

肖德兴，1994；吕世友等，2001；Lü et al.，2003）。这一时期积累的淀粉粒主要是为减数分裂时母细胞进行旺盛的生理活动提供能量来源，同时也可能为减数分裂过程中胼胝质的形成提供碳水化合物（Lü et al.，2003）。在四分体后期阶段，小孢子外壁开始形成，至小孢子游离出来时已形成较厚的外壁，与此同时，母细胞内的淀粉粒也逐渐消失，可能淀粉粒水解参与小孢子外壁的形成。

在正常的小孢子发育过程中，淀粉粒的再次积累出现在小孢子液泡化后第一次有丝分裂前，而且主要分布于与核相对一端小孢子壁内侧的细胞质中，至有丝分裂时达到高峰，但数量明显较减数分裂时少，表明减数分裂时母细胞的生理活动更为旺盛，需要消耗更多的能量或者合成其他新物质。第一次有丝分裂结束产生原叶细胞和分生组织原始细胞之后，淀粉粒也表现出不对称分布，且主要均匀分布在分生组织原始细胞核周围的细胞质中，而原叶细胞中没有观察到淀粉粒存在（图 23），这可能与两个细胞随后发生的生理活动有很大关系，因为分生组织原始细胞随即进行有丝分裂，需要消耗大量能量，而原叶细胞最终要发生退化，其代谢活动也相对较低。当花粉第二次分裂结束后，管细胞内聚集有大量淀粉粒，并逐渐移向靠生殖细胞一侧，生殖细胞中却几乎没有淀粉粒存在。袁宗飞和胡适宜（1998）在研究油松 *Pinus tabulaeformis* Carr.成熟花粉粒的超微结构时也发现类似的分化，并认为管细胞在功能上可能与被子植物的营养细胞相似，很明显在花粉的进一步发育过程中提供必需的营养物质。此外，从淀粉粒的分布位置来看，管细胞可能还为生殖细胞和原叶细胞以后的生理活动提供营养物质或能量。随着成熟花粉粒的进一步发育，至散粉前淀粉粒完全消失，同时花粉粒经 PAS 反应被染成均匀的红色，说明淀粉粒可能被水解转化成蔗糖或其他低聚糖，以提高花粉的渗透压（Datta et al.，2002），从而有利于在干旱条件下传粉时花粉粒保持较高的活力。

3.3　小孢子发生与花粉发育的特点及其保护生物学意义

栽培条件下的越南篦齿苏铁花粉发育的整个过程与其他苏铁类植物极为相似，仅在发育时间上有所不同（表 1）。同时，在不同的植株间，花粉发育过程发生的时间也有所不同，在较早和较晚发生的植株之间相差 15 d 左右。尽管越南篦齿苏铁花粉发育的整个过程需 2 个多月时间，较同属的攀枝花苏铁 *C. panzhihuaensis* L. Zhou & S. Y. Yang 长 1 个多月（吴先军等，1995），但最关键的小孢子母细胞减数分裂与小孢子的两次不对称有丝分裂都在较短时间内完成。由于减数分裂期间，细胞对外界环境的变化非常敏感，高温、低温、干旱等都会导致减数分裂不能正常进行（孙敬三，朱至清，1983），因而在此期间，若出现任何不利于苏铁植物生长的严重的环境因素的变化，都可能直接影响减数分裂过程的正常进行以及成熟花粉粒的形成。而且在这两个重要时期母细胞及小孢子均出现营养物质的大量积累，表明植物体在此期间生理代谢活动十分旺盛，需要消耗大量能量或者合成新的物质，因此必然要求从外界获得更多的营养物质及水分。此外，从我们对苏铁保护中心引种的所有越南篦齿苏铁的观察来看，其散粉时间集中在 7 月中下旬，雨季和空气潮湿会对越南篦齿苏铁传粉产生不利影响。因此，在进行苏铁植物迁地保护时，应根据植物的生殖发育进程，加强对引种苏铁植物的栽培管理，同时还需辅以必要的人工授粉。

值得注意的是，越南篦齿苏铁散粉前多数小孢子囊的中央位置都出现了少数败育的花粉，这些败育的花粉呈长椭圆形，内含物质消失。据观察，小孢子母细胞减数分裂时未

出现异常现象,能形成正常的小孢子,而且败育的花粉几乎全部集中在小孢子囊腔的中央位置,因此花粉粒的败育应该发生于减数分裂后的小孢子发育阶段,但对其败育的具体过程还有待进一步研究。越南篦齿苏铁花粉败育的原因可能一方面与攀枝花苏铁中花粉败育的机理类似,是由于中央区域的花粉粒比处在相对边缘位置的花粉粒要后获得养分(吴先军等,1995);另一方面可能是小孢子囊内花粉发育的一种正常的自我调节作用,即中央区域的花粉发生细胞凋亡,从而为其他花粉的发育提供营养物质或空间条件。

表 1　越南篦齿苏铁小孢子发生及花粉发育时间表

Table 1　Dates for the microsporogenesis and pollen development of *Cycas elongata*

日期 Date	小孢子发育阶段 Developmental stage of microspore	小孢子囊壁发育 Development of microsporangium wall		
		表皮细胞 Epidermal cells	中层细胞 Middle layer cells	绒毡层细胞 Tapetal cells
2003 年 6 月 6 日 Jun. 6, 2003	初生造孢细胞产生 formation of primary sporogenous cell	近方形,切向壁延长 nearly square, tangentially elongated	梭形或多边形 fusiform or polygonal	
2003 年 6 月 10 日 Jun. 10, 2003	次生造孢组织形成 formation of secondary sporogenous tissue	径向延长,垂周壁加厚 radially elongated, vertical wall thickened	长条形 fusiform	
2003 年 6 月 16 日 Jun. 16, 2003	小孢子母细胞形成 formation of microsporocytes		最内层开始退化 innermost layer beginning to degenerate	扁平,单核延长 flattened, elongated uninucleate
2003 年 6 月 22 日 Jun. 22, 2003	减数分裂 I 末期 telophase of meiosis I	径向延长,开始木质化 radially elongated, becoming lignified	内 1–2 层退化 inner 1–2 layers degenerated	扁平,双核 flattened, binucleate
2003 年 6 月 24 日 Jun. 24, 2003	四分体形成 formation of tetrads	进一步木质化 further lignified	内 1–2 层完全退化 inner 1–2 layers totally degenerated	开始解体 beginning to disorganize
2003 年 6 月 26 日 Jun. 26, 2003	四分体解体 disorganization of tetrads	高度木质化 highly lignified	进一步退化,剩外 2–3 层 further degenerated, outer 2–3 layers remained	完全解体 totally disorganized
2003 年 6 月 29 日 Jun. 29, 2003	单核小孢子液泡化 uninucleate microspores with large vacuole		进一步退化 further degenerated	仅剩残迹 only trace remained
2003 年 7 月 12 日 Jul. 12, 2003	二细胞花粉 two-celled pollen		成一薄层 becoming a lamella	完全退化 totally degenerated
2003 年 7 月 14 日 Jul. 14, 2003	三细胞花粉粒 mature pollen with three cells			消失 disappeared
2003 年 7 月 28 日 Jul. 28, 2003	散粉 dispersal of pollen	环带开裂 dehiscence of annulus	留有残迹 trace remained	

致谢　本研究承蒙深圳市仙湖植物园苏铁种质资源保护中心刘芳齐同志采集部分材料,广西大学苏俊霞同学和湖南农业大学张雪芹同学在实验中给予大量帮助并提供部分重要

文献，华南农业大学农学院刘向东教授在显微荧光技术方面给予了重要指导，中国科学院植物研究所母锡金研究员、路安民研究员、王宇飞研究员为文章提出宝贵的修改建议，在此一并致谢。

参 考 文 献

Audran J C. 1981. Pollen and tapetum development in *Ceratozamia mexicana* (Cycadaceae): sporal origin of the exinic sporopollenin in cycads. Review of Palaeobotany and Palynology 33: 315 – 346.

Baird A M. 1939. A contribution to the life history of *Macrozamia riedlei*. Journal of the Royal Society of Western Australia 25: 153 – 175.

Biswas C, Johri B M. 1997. The Gymnosperms. New Delhi: Narosa Publishing House. 63 – 68.

Caddick L R, Furness C A, Stobart K L, Rudall P J. 1998. Microsporogenesis and pollen morphology in Dioscoreales and allied taxa. Grana 37: 321 – 336.

Chen J-R (陈家瑞), Li N (李楠). 2003. Advances in some plant groups in China II. Advances in research and conservation of cycads in China. Acta Botanica Sinica (植物学报) 45 (suppl.): 21 – 26.

Chu C (朱□). 1963. The application of PAS reaction as a stain technique in plant histology. Acta Botanica Sinica (植物学报) 11: 155 – 164.

Datta R, Chamusco K C, Chourey P S. 2002. Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. Plant Physiology 130: 1645 – 1656.

Davis G L. 1966. Systematic Embryology of the Angiosperms. New York: John Wiely & Sons. Inc.

De Laubenfels D J, Adema F. 1998. A taxonomic revision of the genera *Cycas* and *Epicycas* gen. nov. (Cycadaceae). Blumea 43: 351 – 400.

De Silva B L T, Tambiah M S. 1952. A contribution to the life history of *Cycas rumphii* Miq. Ceylon Journal of Science 12A: 1 – 22.

Foster A S, Gifford E M. 1974. Comparative Morphology of Vascular Plants. 2nd ed. San Francissp: W. H. Freeman and Company. (李正理, 张新英, 李荣敖, 崔克明译. 1983. 维管植物比较形态学. 北京: 科学出版社. 351.)

Furness C A, Rudall P G. 1999. Microsporogenesis in monocotyledons. Annals of Botany 84: 475 – 499.

Furness C A, Rudall P G. 2000. The systematic significance of simultaneous cytokinesis during microsporogenesis in monocotyledons. In: Wilson K L, Morrison D A eds. Monocots: Systematics and Evolution. Collingwood: CSIRO Publishing. 186 – 190.

Furness C A, Rudall P G, Sampson F B. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. International Journal of Plant Sciences 163: 235 – 260.

González F, Rudall P J, Furness C A. 2001. Microsporogenesis and systematics of Aristolochiaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 137: 221 – 242.

Herr J M. 1984. Embryology and taxonomy. In: Johri B M ed. Embryology of Angiosperms. Berlin: Springer Verlag. 647 – 696.

Hill K D. 1994. The *Cycas rumphii* complex (Cycadaceae) in New Guinea and the Western Pacific. Australian Systematic Botany 7: 543 – 567.

Hill K D. 1995. Infrageneric relationships, phylogeny and biogeography of the genus *Cycas* (Cycadaceae). In: Vorster P ed. Proceedings of the Third International Conference on Cycad Biology. Stellenbosch: Cycad Society of South Africa. 139 – 162.

Hu S-Y (胡适宜). 1982. Embryology of Angiosperms (被子植物胚胎学). Beijing: Higher Education Press. 20 – 66.

Johri B M, Ambegaokar K B, Srivastava P S. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms. Berlin: Springer Verlag. 13 – 14.

Jones D L. 2002. Cycads of the World. Washington: Smithsonian Institution Press. 2: 125 – 133.

Juncosa A M, Tobe H. 1988. Embryology of tribe Gynotrocheae (Rhizophoraceae) and its developmental and

systematic implications. Annals of the Missouri Botanical Garden 75: 1410–1424.

Leandri J D. 1931. Cycadaceae. In: Lecomte M H ed. Flore Générale de l'Indo-Chine. Paris: Masson. 5 (10): 1085–1092.

Lü S-Y (吕世友), Li Y-F (李彦舫), Chen Z-K (陈祖铿), Lin J-X (林金星). 2001. Review on pollen development. Chinese Bulletin of Botany (植物学通报) 18: 340–346.

Lü S, Li Y, Chen Z, Lin J. 2003. Pollen development in *Picea asperata* Mast. Flora 198: 112–117.

Norstog K J, Nicholls T J. 1997. The Biology of Cycads. Ithaca: Cornell University Press.

Pennell R I, Bell P R. 1986. Microsporogenesis in *Taxus baccata* L.: the formation of the tetrad and development of the microspores. Annals of Botany 57: 545–555.

Rao L N. 1961. Life history of *Cycas circinalis* L. (Part I). Microsporogenesis, male and female gametophytes and spermatogenesis. Journal of the Indian Botanical Society 40: 601–619.

Singh H. 1978. Embryology of Gymnosperms. Berlin: Gebruder Borntraeger. 20–25.

Sun J-S (孙敬三), Zhu Z-Q (朱至清). 1983. Structure and Function of Plant Cell (植物细胞的结构与功能). Beijing: Science Press. 146–153.

Tobe H. 1989. The embryology of angiosperms: its broad application to the systematic and evolutionary study. Botanical Magazine (Tokyo) 102: 351–367.

Wang D-Y (王定跃). 1996a. Systematic classification and geographic distribution of Cycadaceae. In: Wang F-X (王发祥), Liang H-B (梁惠波) eds. Cycads in China. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press. 9–32.

Wang D-Y (王定跃). 1996b. Taxonomy of *Cycas* in China. In: Wang F-X (王发祥), Liang H-B (梁惠波) eds. Cycads in China. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press. 33–142.

Wang D-Y (王定跃). 2000. Studies on Morphology, Anatomy, Taxonomy and Evolution of Cycadaceae. Nanjing Forestry University. PhD Thesis. 1–159.

Whitelock L M. 2002. The Cycads. Portland: Timber Press. 110–111.

Wu X-J (吴先军), Li P (李平), Li C-L (李朝銮). 1995. Investigation on the reproductive biology of *Cycas panzhihuaensis*—microsporogenesis and development of pollen grain. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition) (四川大学学报(自然科学版)) 32 (suppl.): 69–76.

Xiao D-X (肖德兴). 1994. Starch grains and callose of pollen in *Pinus massoniana* Lamb. Acta Biologiae Experimentalis Sinica (实验生物学报) 27: 37–40.

Xiao D-X (肖德兴), Chen Z-K (陈祖铿). 1990. Investigation on the ontogeny of pollen in *Pinus thunbergii* Parl. Acta Botanica Sinica (植物学报) 32: 847–851.

Yuan Z-F (袁宗飞), Hu S-Y (胡适宜). 1998. Ultrastructural and cytochemical study on mature pollen of *Pinus tabulaeformis*. Acta Botanica Sinica (植物学报) 40: 389–394.